

München, 1960.

Untersuchungen über die freien
Aminosäuren im Blutplasma von
Gesunden und von Leberkranken

Alfred Reitlinger

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FREIEN AMINOSÄUREN
IM BLUTPLASMA VON GESUNDEN
UND VON LEBERKRANKEN

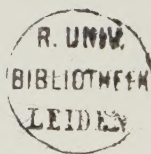
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alfred Reitlinger
aus
München

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. H. Zickgraf
Correferent: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Professor Dr. Dr. H. Eyer
Tag der mündlichen Prüfung: 8. 11. 60



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zum Problem	1
A. Auswahl der Fälle	1
B. Methodik	2
I. Aufbereitung des Blutes	2
II. Hochspannungselektrophorese	3
III. Papierchromatographie	3
IV. Färbung	3
V. Ergänzende Nachweisverfahren	4
VI. Auswertung	4
C. Ergebnisse	5
I. Normalfälle	5
II. Eiweißbelastungen	7
III. Hepatitisfälle	7
IV. Lebercirrhosen	8
V. Sonstige Untersuchungen	9
D. Diskussion	10
Zusammenfassung	12
Literaturverzeichnis	13
Nachwort	26
Lebenslauf	27

ZUM PROBLEM

Die Leber ist für den Aminosäurestoffwechsel von zentraler Bedeutung. Es ist daher nicht verwunderlich, daß seit langem bei Erkrankungen dieses Organs Abweichungen vom normalen Spektrum der Blutaminosäuren beobachtet werden (1 - 11), insbesondere eine Vermehrung schwefelhaltiger und zyklischer Aminosäuren. Man hat daraus sogar differentialdiagnostische und prognostische Schlüsse ziehen zu können geglaubt. Über Art und Umfang dieser Veränderungen bestehen jedoch zwischen den Angaben verschiedener Autoren erhebliche Unterschiede und Widersprüche. Da uns in der Kombination von Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie ein Verfahren zur Verfügung stand, das schnell das Aminosäurespektrum von Körperflüssigkeiten und Organen zu überblicken gestattet (12), erschien es lohnend, damit bei Leberkranken erneut die Blutaminosäuren zu untersuchen.

Die vorliegende orientierende Studie sollte zunächst die Frage klären, wie weit bei den klinisch wichtigsten Lebererkrankungen Cirrhose und Hepatitis pathologische Veränderungen im Spektrum der freien Plasmaaminosäuren konstant nachweisbar sind. In späteren Untersuchungen sollten gegebenenfalls quantitative Aminosäureanalysen mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie, einer Methode, die sehr genaue Ergebnisse liefert (13 - 16), angeschlossen werden. Die erzielten Ergebnisse und einige mit dieser quantitativen Methodik gewonnene Stichversuche lassen diesen Weg im Augenblick jedoch nicht besonders erfolgversprechend erscheinen. Die gefundenen Unterschiede zum Normalen waren meist gering und ziemlich uncharakteristisch.

A. AUSWAHL DER FÄLLE

Insgesamt wurden 64 Blutplasmen untersucht. Eine größere Anzahl von Fällen mußte wegen nicht ganz geklärter Diagnosen oder wegen unvollkommener Technik bei der Aufarbeitung des Blutes später ausgeschieden werden.

Als Normalfälle wurden die Plasmen von 11 gesunden Versuchspersonen (Studenten, Laborpersonal, Patienten mit lediglich funktionellen Störungen) verwendet. Bei vier Probanden wurden Eiweißbelastungen durchgeführt. Ferner wurden die Plasmen von 7 Patienten mit Lebercirrhose, 8 Patienten

mit Hepatitis, 2 Patienten mit Stauungsleber, 1 Patientin mit Leberschaden in graviditate, außerdem von 1 Person mit Metastasenleber und zum Vergleich von 2 Patienten mit Wilsonscher Krankheit, 2 Patienten mit diffuser Glomerulonephritis und 1 Person mit nephrotischem Symptomenkomplex untersucht.

Die Diagnose der Leberfälle wurde stets durch zahlreiche klinische und Laborbefunde gesichert. Bei einem Teil wurde sie durch Biopsien oder durch spätere Sektion belegt.

B. METHODIK

I. Aufbereitung des Blutes

10 ml Kubitalvenenblut wurden in ein Zentrifugenglas aufgefangen, in das als Anticoagulans 40 mg Natriumfluorid eingewogen waren. Nach vorsichtigem Umrühren wurden die Zellen sofort abzentrifugiert. Das Plasma wurde mit der vierfachen Menge vorgekühlten Acetons versetzt und nach 30 Minuten langem Stehen in der Kälte der Eiweiß- und Salzniederschlag in einer Kühlzentrifuge bei hoher Tourenzahl abgetrennt. Durch dieses Vorgehen kann ein großer Teil der anorganischen Salze schonend entfernt werden. Der Überstand wurde im Vakuum fast bis zur Trockne eingengt und dann mit destilliertem Wasser auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens gebracht. Zur Entfernung der bei der elektrolytischen Entsalzung störenden Lipide wurde mehrfach mit Äther ausgeschüttelt. Die Untersuchung der Ätherphase ergab, daß dabei kein Aminosäureübertritt erfolgte.

Für die Entsalzung fand die von Knauff u. Mitarb. (12) angegebene, eine intensive Kühlung gestattende modifizierte Entsalzungsapparatur nach Astrup (17) Verwendung. Die Entsalzung wurde begonnen mit einer Spannung von 80 V. Dabei betrug die Stromstärke bei mit Äther extrahiertem Plasma 250 - 300 mA, sonst bis zu 600 mA. Nach 30 Minuten wurde die Entsalzung bei einer meist auf 80 - 100 mA gesunkenen Stromstärke abgebrochen. Bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß der Stromfluß bei mit Äther ausgeschütteltem Plasma erheblich geringer war, ein Zeichen dafür, daß ein Teil der Ionen sich mit Äther entfernen läßt. Ohne elektrolytische Entsalzung ließen sich jedoch einwandfreie Chromatogramme nicht erzielen. Die entsalzte Lösung wurde im Vakuum erneut zur Trockne eingengt und der Rückstand mit 1/25 des ursprünglichen Plasmavolumens in 0,1 n HCl aufgenommen.

II. Hochspannungselektrophorese

Es wurde eine auf 60 x 35 cm vergrößerte Elektrophoreseapparatur nach Werner (18) verwendet. Trotz dieser verhältnismäßig großen Breite lagen auch weit wandernde Substanzen noch annähernd parallel zu ihrer Auftragslinie. Als Elektrolyt kam das von Kickhöfen und Westphal (19) erprobte Puffergemisch aus Ameisensäure, Eisessig, Wasser (1 : 3 : 16) zur Anwendung, das ein p_H von 1,9 aufweist und eine optimale Auftrennung der neutralen Aminosäuren erreichen läßt. Die Filterpapierbogen (Schleicher u. Schüll 2045 b, Format 29 x 75) wurden zur Erzielung einer gleichmäßigen Durchfeuchtung vor Einbringen in die Kammer kurz in die Elektrolytlösung getaucht und anschließend in einer Walzenpresse ausgepreßt. Das Plasma wurde punktförmig 15 cm vom schmalen anodennahen und 4 cm vom breiten Rand des Papiers entfernt aufgetragen. Nach 90 Minuten dauernder Elektrophorese mit einer Spannung von 4000 V (60 - 70 V/cm) wurde der Bogen bei 70° C getrocknet.

Als geeignete Ausgangsmenge erwiesen sich 0,03 ml des 25 : 1 eingeeengten Plasmas, entsprechend 0,75 ml Originalplasma. Diese relativ geringe Auftragsmenge erlaubt zwar nicht die Identifizierung auch aller nur in Spuren vorhandenen Substanzen, die wichtigsten Aminosäuren werden jedoch viel besser getrennt. Die Überlappung einzelner Flecken wird weitgehend vermieden und dadurch die Auswertung erleichtert.

III. Papierchromatographie

In zweiter Dimension wurden die Bogen senkrecht zur elektrophoretischen Laufrichtung in Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 5) 20 Stunden aufsteigend chromatographiert und wiederum bei 70° C getrocknet.

IV. Färbung

Die Bogen wurden mit Ninhydrin nach Levy u. Chung (20) gefärbt. Die Empfindlichkeit und Differenziertheit dieser Färbung wurde von keiner anderen der erprobten Aminosäurefärbungen übertroffen. Um eine möglichst einheitliche Färbung für die quantitative Auswertung und eine längere Haltbarkeit zu erreichen, wurde die Ninhydrinfärbung nach dem Vorschlag von Kawerau u. Wreland (21) in ihren Kupferkomplex übergeführt, sobald die Flecken identifiziert waren. Alle Aminosäuren erscheinen dadurch annähernd gleichmäßig hellrot.

V. Ergänzende Nachweisverfahren

Durch die Kombination Elektrophorese - Chromatographie konnten die meisten Aminosäuren gut isoliert werden. Nicht in allen Fällen sicher getrennt waren Glutamin von Asparaginsäure, Threonin von Glutaminsäure und Leucin von Isoleucin. Für den sicheren Nachweis von Cystin und Cystein war die Ninhydrinfärbung nicht empfindlich genug. Deshalb wurden zwei weitere spezielle Nachweisverfahren in Anwendung gebracht:

Asparaginsäure und Glutaminsäure, die im Plasma in verhältnismäßig geringen Mengen vorliegen und deshalb bei ungenügender Trennung leicht von anderen Substanzen verdeckt werden, ließen sich auf eindimensionalen Elektrophoresestreifen, die bei p_H 3,6 angefertigt wurden, mit Sicherheit erkennen. Dabei wurde ein Puffer aus Pyridin, Eisessig, Wasser (1 : 10 : 90) verwendet. Die beiden Dicarbonsäuren wandern bei diesem p_H in zwei scharfen Banden anodenwärts, während sich die neutralen und basischen Aminosäuren zur Kathode bewegen. Von jedem Plasma wurden solche eindimensionalen Elektrophoresestreifen gefertigt.

Zum Nachweis von Cystin/Cystein wurden jeweils eindimensionale Chromatogramme (Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 5) mit einer von Turba (22) angegebenen Lösung aus Kaliumpermanganat und Natriumcarbonat gefärbt. Cystin/Cystein und Methionin erscheinen dabei gelb auf braunem Untergrund, sie können aufgrund ihres sehr unterschiedlichen R_F -Wertes nicht verwechselt werden.

Auf eine Trennung von Cystin/Cystein und Leucin/Isoleucin haben wir verzichtet. Beide Substanzen wurden gemeinsam bestimmt.

VI. Auswertung

Unser Vorgehen erlaubt eine gute Trennung zahlreicher Substanzen und den Nachweis auch sehr geringer Stoffmengen. Als zweidimensionales Verfahren ist es jedoch für quantitative Bestimmungen weniger geeignet. Um eine ungefähre Vergleichsmöglichkeit zwischen den einzelnen Fällen zu gewinnen, haben wir nach Walshe (5) die Farbflecken nach Größe und Farbintensität in willkürliche Abstufungen von 1 - 12 unterteilt. Die aus sämtlichen Elektropherochromatogrammen einer Serie (Normalfälle und pathologische Fälle) gezogenen Durchschnittswerte wurden auf den nächstgelegenen halben Wert auf- oder abgerundet. Die einzelnen Substanzen können

nur mit sich selbst verglichen werden, da ihre Ninhydrinempfindlichkeit verschieden ist. Die Auswertung erfolgte stets unter gleichen Beleuchtungsbedingungen. Um möglichst einheitliche Fleckengrößen zu erreichen, wurden alle technischen Details, wie Laufzeit, Spannung, Temperatur etc. in allen Versuchen weitgehend konstant gehalten. Für orientierende Untersuchungen an klinischem Material war das Verfahren so recht brauchbar.

C. ERGEBNISSE

I. Normalfälle

Wir fanden im Blutplasma des Gesunden stets die 18 ninhydrinpositiven Substanzen Aethanolamin, Alanin, Asparaginsäure, Cystin/Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Leucin/Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin und Valin. Arginin wurde nur bei 2 Normalfällen, α -Aminobuttersäure nur in 8 Fällen und Tryptophan in 10 Fällen nachgewiesen. Außerdem waren meist einige schwächere, nicht näher identifizierte Flecken vorhanden, die wir unberücksichtigt ließen.

Abb. 1 zeigt ein typisches zweidimensionales Elektropherochromatogramm der freien Aminosäuren des normalen Plasmas.

Die deutlichsten Flecken wurden durch Alanin, Glutamin, Glykokoll, die Leucine, Serin, Threonin und Valin hervorgerufen. Sehr schwach, oft kaum erkennbar, waren die Flecken von Aethanolamin, α -Aminobuttersäure, Arginin und Tryptophan. Die Fleckengröße der anderen Aminosäuren liegt in der Mitte. Dies Verhalten entspricht der tatsächlichen Konzentration dieser Stoffe (23). Relative Farbdichte und Fleckengröße in unserer willkürlichen Wertskala von Normalfällen und Leberkranken findet sich in Tabelle 1. Der Versuch, Fleckengröße und Farbdichte der verschiedenen Aminosäuren zwecks besserer Vergleichbarkeit in ein Schema willkürlicher relativer Werte einzuordnen, kann im Einzelfall leicht zu Fehldeutungen Anlaß geben. Größere Serien gleichartiger Chromatogramme zeigten jedoch meist ein ziemlich charakteristisches Verhältnis der einzelnen Aminosäuren zueinander.

Tabelle 1

Mengen verschiedener Plasmaamino-säuren in willkürlichen Einheiten,
beurteilt nach Fleckengröße und Farbintensität zweidimensionaler
Elektropherogramme

- Spalte 1: Durchschnittswerte von 22 Chromatogrammen
von 11 gesunden Versuchspersonen
- Spalte 2: Durchschnittswerte von 10 Chromatogrammen
von 7 Fällen von Lebercirrhose
- Spalte 3: Durchschnittswerte von 11 Chromatogrammen
von 8 Fällen von Hepatitis
- Spalte 4: Durchschnittswerte von 2 Chromatogrammen
von 2 Fällen von Stauungsleber
- Spalte 5: Durchschnittswerte von 3 Chromatogrammen
von 2 Fällen von M. Wilson.

Die Werte der einzelnen Aminosäuren sind nur untereinander vergleichbar.

Substanz

Äthanolamin	2	3	3	2	2
Alanin	12	12	12	11	12
α -Aminobutters.	1,5	2,5	1,5	1,5	1
Arginin	1	2	1	-	-
Asparaginsäure	2	2	2	2	2
Cystin/Cystein	2,5	3	3	3	2,5
Glutamin	8	10	10	7	8
Glutaminsäure	3	3	3	3	3
Glykokoll	7	6	6	7	7
Histidin	5	4	5	5	5
Leucin/Isol.	11	12	11	12	12
Lysin	6	6	6	6	6
Methionin	3	3,5	3,5	3,5	2,5
Phenylalanin	3	7	5	3	3
Prolin	4	7	6	3	4
Serin	6	5	6	5	5
Taurin	6	6	6	6	6
Threonin	6	7	6	6	6
Tryptophan	2,5	4,5	4	2	2
Tyrosin	3,5	8	6	4	4
Valin	10	9	9	10	9

II. Eiweißbelastungen

Durch Eiweißbelastungen sollte geklärt werden, ob Diätunterschiede oder ein verschiedener zeitlicher Abstand der Blutentnahme von der letzten Nahrungsaufnahme eine wesentliche Fehlerquelle darstellen. Die Plasma-aminosäuren wurden bei diesen Versuchen nüchtern, 30 Minuten und 60 Minuten nach einem Quarkfrühstück (0,5 g Eiweiß/kg Körpergewicht) untersucht. Nach 30 Minuten waren fast sämtliche Flecken entsprechender Chromatogramme deutlich größer und intensiver gefärbt. Auf unserem in Abb. 2 - 4 demonstrierten Beispiel liegen Prolin und α -Aminobuttersäure beim Nüchternwert (Abb. 2) noch unter der Wahrnehmbarkeitsgrenze, während sie nach dem Quarkfrühstück gut zu erkennen sind, obwohl die Auftragsmenge jeweils die gleiche blieb. Bereits nach 60 Minuten waren die Veränderungen wieder rückläufig. Wir glauben daher nicht, daß die am Nüchternblut gewonnenen Ergebnisse durch die am Abend vorher genossene Diät modifiziert werden und hatten keine Veranlassung, unsere Patienten auf ein besonderes Diätregime vor der Untersuchung zu setzen. Inzwischen gewonnene quantitative Ergebnisse an einer größeren Zahl von Versuchspersonen bestätigten dies (24). Von Clemetson u. Churchmaß (25) wurde das Maximum der Resorption ebenfalls bereits nach 30 Minuten gefunden. 8 Stunden nach der Nahrungsaufnahme waren keine Veränderungen mehr nachweisbar. Auch nach den Feststellungen anderer Autoren ist beim Menschen die Diät ohne wesentlichen Einfluß auf die Höhe der Plasmaaminosäuren (26 - 32).

III. Hepatitisfälle

Die Veränderungen waren ziemlich spärlich und uncharakteristisch. Es konnte meist eine Vermehrung von Tyrosin, Phenylalanin, Prolin und Tryptophan beobachtet werden. Manchmal erschien das Aethanolamin etwas vermehrt, in einigen Fällen auch das Glutamin. Veränderungen fanden sich vorwiegend bei den schweren Fällen, jedoch fehlten eindeutige Beziehungen zum klinischen Bild oder zum Ausfall der übrigen Laborreaktionen. In Tabelle 2 sind diese zusammengefaßt.

Tabelle 2

Serumbilirubinwerte und Ausfall verschiedener Serumlabilitätsproben
bei 8 Patienten mit Hepatitis

(Bilirubin direkt und indirekt nach Hijmans van den Bergh (33);
Takata-Reaktion, abgestuft nach Mancke - Sommer (34); Thymol-
test nach Mac Lagan (35); Weltmannsches Koagulationsband (36)).

Patient	Bilirubin dir./ind.	Takata- Reakt.	Thymol- Test	Weltmann- Band
K. A.	++/4, 0	+	+++	7, 5
L. A.	16, 6/17, 0	100	++++	7, 5
N. R.	++/3, 5	++	+++	8
F. G.	++/4, 85	Ø	+++	6
S. H.	6, 4/8, 3	++	+++	7, 5
W. A.	9, 0/11, 8	90	++++	8
M. S.	++/5, 2	++	+++	8
A. M.	++/2, 4	Ø	+++	7, 5

IV. Lebercirrhosen

Auch auf den Chromatogrammen dieser Fälle traten keine neuen Flecken auf. Alle bekannten Flecken blieben nachweisbar. Eine wesentliche Vermehrung der Gesamtaminosäuremenge war nicht ersichtlich. Als einziger deutlicher Unterschied fand sich in den meisten Fällen eine Vermehrung von Tyrosin, Phenylalanin und Prolin. Bei einigen Patienten waren auch Aethanolamin, α -Aminobuttersäure, Arginin, Threonin und Tryptophan etwas vermehrt. In Tabelle 3 sind die klinischen Daten dieser Fälle aufgeführt.

Tabelle 3

Überblick über Serumbilirubinwerte, Serumlabilitätsreaktionen, Anteil der γ -Globuline in Relativ% und sonstigen klinischen Befund bei 7 Patienten mit Lebercirrhosen

Bei den Patienten S.K. und S.H. handelte es sich um posthepatitische Cirrhosen. Pat. H.M. hatte eine cholangitische Cirrhose. Die Genese der anderen Fälle blieb ungeklärt.

Patient	Bilirub. dir. /ind.	Takata Reakt.	Thymol Test	Weltm. Band	γ -Glo- buline	Bemer- kungen
D.K.	2, 1/3, 1	50	1, 4	8	37, 4	Coma, Ascites
H.M.	17, 5/18, 3	40	3, 0	8	50, 6	Coma, Ascites
S.K.	0/0, 28	++	++	7, 5	32, 0	Ascites
S.H.	2, 0/3, 1	+++	++++	10	58, 0	Coma, Ascites
M.H.	0/0, 78	++(+)	++(+)	7, 25	47, 8	
G.A.	1, 33/1, 9	70	0, 9	6	36, 9	
Gr.A.	0/0, 26	++	+++	8	42, 1	Ascites

V. Sonstige Untersuchungen

Bei einem Fall von Metastasenleber wurde ebenfalls eine Tyrosin- und Phenylalaninvermehrung gefunden. Die Fälle von Stauungsleber sowie von M. Wilson zeigten ein völlig normales Blutaminosäurespektrum, desgleichen ein Fall einer Schwangerschafts hepatopathie mit Cystopyelitis.

Dagegen zeichneten sich die beiden Fälle von Glomerulonephritis durch einen auffallend hohen Gehalt an Asparaginsäure aus, der mindestens das Doppelte oder Dreifache der Norm betrug und durch eine Verminderung der Glutaminsäure. Es sei dies an Abb. 5 u. 6 demonstriert, die gleichzeitig ein Beispiel für die Anwendung der eindimensionalen Elektrophorese bei p_H 3,6 zur isolierten Darstellung von Asparaginsäure und Glutaminsäure bieten.

Bei einer Patientin, mit nephrotischem Symptomenkomplex wurde ein normaler Aminosäurespiegel gefunden.

D. DISKUSSION

Die meisten unserer Voruntersucher bedienten sich zur getrennten Bestimmung der einzelnen Aminosäuren mikrobiologischer Methoden (3, 4, 37-40) oder in neuerer Zeit der weniger aufwendigen Papierchromatographie (1, 2, 5-11). Dabei wurde die Konzentration der chromatographisch getrennten Substanzen vielfach je nach Größe der erhaltenen Flecken mit einem oder mehreren Kreuzen bewertet oder mit willkürlichen Zahlenwerten versehen (5, 6). Wir konnten zwar durch Verwendung der Hochspannungselektrophorese die Auftrennung der verschiedenen Stoffe wesentlich verbessern, die ziemlich unbefriedigende Auswertung der Chromatogramme durch rein visuellen Vergleich mußte jedoch beibehalten werden. Die versuchte kolorimetrische Auswertung der aus zweidimensionalen Chromatogrammen eluierten Aminosäureflecken bedeutete keinen Vorteil. Das Verfahren ist nach unseren Erfahrungen und dem Urteil kritischer Autoren (31) mit einer Fehlergrenze von mindestens 30 % belastet. Wir gaben es nach einigen unbefriedigenden Vorversuchen auf, da die erhaltenen Werte lediglich eine Pseudogenauigkeit vortäuschten.

Im ganzen waren die Veränderungen bei Lebererkrankungen ziemlich gering und es bestand eine sehr große Schwankungsbreite sowohl innerhalb der untersuchten Gruppen als auch bei ein und demselben Patienten. Deutliche Abweichungen wurden nur bei schweren Erkrankungen gefunden. Bei allen kompensierten Cirrhosen und weniger schweren Hepatitiden ist die Funktionsreserve der Leber für den Aminosäurestoffwechsel wahrscheinlich so groß, daß nachweisbare, sich auf das Aminosäurespektrum im Plasma auswirkende Störungen sehr lange ausbleiben. Mann (41) beobachtete am Hund nach Entfernung von 60 % des Lebergewebes keinen Aminosäureanstieg im Blut und Harn, wenn die Tiere nicht zusätzlich durch Aminosäureinfusionen belastet wurden. Erst nach Entfernung von 85 % des Lebergewebes fand er deutliche Auswirkungen auf den Aminosäurestoffwechsel. Allerdings berücksichtigte er nicht die Einzelaminosäuren, sondern bestimmte lediglich den wahrscheinlich strenger regulierten (23) Gesamt-Aminostickstoff. Die jeweils noch vorhandene Funktionsreserve der Leber ist klinisch besonders schwer festlegbar. Systematische Aussagen sind daher an klinischem Material sehr schwierig.

Alle Veränderungen waren im allgemeinen im Plasma weniger deutlich als in parallel durchgeführten Untersuchungen (42) im Harn. Walshe (5) erklärt diesen Befund damit, daß eine geringe, mit seiner relativ

unempfindlichen Methode schwer faßbare Vermehrung einer bestimmten Aminosäure im Plasma bereits zu einer stärkeren Mehrausscheidung führe, wenn einmal ein gewisser Schwellenwert in der Niere überschritten ist. Exakte Clearanceuntersuchungen, die dies entscheiden können, stehen jedoch bei Leberkranken noch aus.

Als Ursachen für die Veränderungen im Aminosäurespiegel des Plasmas wurden von früheren Autoren im wesentlichen autolytische Prozesse des Lebergewebes beim Leberzelluntergang angesehen (43 - 46). Daneben hat man heute als die ausschlaggebenden Faktoren den Funktionsausfall der Leber im Oxydationsvermögen, der Desaminierung und im Eiweißaufbau herausgestellt (7, 8, 10). Die in unseren Fällen gefundenen Erhöhungen ganz bestimmter Aminosäuren läßt sich auch weniger als Folge eines Eiweißzerfalls, sondern eher als Ausdruck der Störung bestimmter Funktionssysteme im Leberstoffwechsel deuten.

Beim gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse sollten deshalb zunächst systematische Untersuchungen bei experimentellen Leberschäden an Versuchstieren vorgenommen werden. Zunächst werden selbst genaue, am klinischen Einzelfall erhobene Werte nur schwer zu einer vertieften Einsicht über die Funktion der Leber im Aminosäurestoffwechsel bei diesen Erkrankungen führen

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (47 - 49) fanden wir bei M. Wilson keinerlei Veränderungen der Plasmaamino­säuren. Die bei denselben Fällen beobachtete Aminoacidurie verstärkten Ausmaßes (42) beruht demnach in erster Linie auf einem renalen Mechanismus und nicht auf der Lebercirrhose, die gleichzeitig besteht. Die meisten Autoren bestätigen diese Ansicht (33, 34, 50).

Die sehr auffällige Asparaginsäurevermehrung im Plasma der beiden Patienten mit Glomerulonephritis findet ihre Parallele in dem starken Anstieg von Asparaginsäure, den Dunn (51) bei urämischen Hunden feststellte.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Aminosäurezusammensetzung von 64 Blutplasmen von Normalpersonen und von Patienten mit Lebercirrhosen, Hepatitiden und einigen anderen Krankheiten (Morbus Wilson, Glomerulonephritis etc.) wurden untersucht.
2. Die Einzelaminosäuren wurden mit Hilfe eines zweidimensionalen kombinierten hochspannungselektrophoretisch - papierchromatographischen Verfahrens und einiger ergänzender Nachweisverfahren getrennt bestimmt.
3. Abweichungen vom normalen Aminosäurespektrum fanden sich nur bei schweren Lebercirrhosen und bei Hepatitiden stärkeren Ausmaßes im ersten akuten Stadium der Erkrankung. Die Funktionsreserve der Leber für den Aminosäurestoffwechsel scheint demnach ziemlich groß zu sein.
4. Die Veränderungen sind zu uncharakteristisch und zu inkonstant, als daß daraus sichere differentialdiagnostische oder prognostische Schlüsse gezogen werden könnten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. C.E. Dent: Aminosäurestoffwechsel
Schw. Med. Wschr. 80, 752, 1950
2. C.E. Dent, J.M. Walshe,
S. Sherlock u.
G.E.W. Wolstenholm: Ciba Foundation Symposium on Liver Disease.
S. 22, Edit. Churchill London 1951
3. K. Schreier u.
H. Sattelberg: Untersuchungen über den Aminosäurestoffwechsel
bei Erkrankungen der Leber.
Dtsch. Med. Wschr. 76, 866, 1951.
4. M. Cachin, J. Durlach u.
J. Blass: Les acides aminés du sérum sanguin en pathologie
hépatique.
Semaine Hôp. 3231, 1953.
5. J.M. Walshe: Disturbances of aminoacid metabolism following
liver injury.
Quart. J. Med. 88, 483, 1953.
6. D. Yi-Yung Hsia u.
S.S. Gellis: Amino acid metabolism in infectious hepatitis
J. Clin. Invest. 33, 1603, 1954.
7. H. Bickel u.
F. Souchon: Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde.
Arch. Kinderheilk. 31, Beiheft 1955
8. D. Müting: Der Aminosäurehaushalt des Menschen.
Arzneimittelforschung 8. Beiheft 1955
9. J.M. Walshe u.
B. Senior: Disturbances of cystine metabolism in liver
disease.
J. Clin. Invest. 34, 302, 1955.

10. F. Wewalka: Beziehungen zwischen Störungen des Aminosäurestoffwechsels und Leberkrankheiten.
Acta hepatol. 4, 137, 1956.
11. F.L. Iber, H. Rosen, S.M. Levenson
u. T.C. Chalmers: The plasma amino acids in patients with liver failure.
J. Lab. a. Clin. Med. 50, 417, 1957.
12. H.G. Knauff, W. Mialkowski
u. H. Zickgraf: Über die freien Aminosäuren des Liquor cerebrospinalis und ihren Nachweis mit kombinierten papierchromatographischen und elektrophoretographischen Methoden.
Z.klin. Med. 155, 483, 1959.
13. S. Moore, D.H. Spackmann,
W.H. Stein: Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system.
Analyt. Chem. 30, 1185, 1958.
14. D.H. Spackmann, W.H. Stein,
S. Moore: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Analyt. Chem. 30, 1190, 1958.
15. K. Hannig: Erfahrungen mit der quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen und automatischer Bestimmung der Ergebnisse.
Clin. Chim. Acta 4, 51, 1959.
16. H.G. Knauff, H. Selmair,
H. Zickgraf: Die freien Aminosäuren in Ascites- und Pleurapunktaten.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 318, 108, 1959.
17. T. Astrup, A. Stage u.
E. Olsen: A desalting apparatus for amino acids.
Acta chem. scand. 5, 1353, 1951.

18. G. Werner: Eine Apparatur zur Hochspannungs-Papier-
elektrophorese.
Rec. Trav. chim. Pays-Bas 74, 613, 1955.
19. B. Kickhöfen u.
O. Westphal: Trennung der Aminosäuren- und Peptidge-
mische durch Hochspannungs-Papierionophorese.
Z. Naturforsch. 7b, 655, 1953.
20. A.L. Levy u.
D. Chung: Two - dimensional chromatography of amino
acids on buffer paper.
Analyt. Chem. 25, 396, 1953.
21. E. Kawerau u.
T. Wieland: Conservation of amino acid chromatograms.
Nature, 168, 77, 1951.
22. F. Turba: Chromatographische Methoden in der Protein-
chemie.
S. 89, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
Springer 1954.
23. H.G. Knauff, P. Dieterle
u. H. Zickgraf: Quantitative Bestimmung von 21 freien Ami-
nosäuren bei gesunden Versuchspersonen.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 316,
186, 1959.
24. H.G. Knauff u.
P. Schabert: noch unveröffentlicht.
25. C.A.B. Clemetson u.
J. Churchman: Plasma amino-acid level following protein
ingestion by pregnant and non-pregnant
subjects.
J. Obstet. a. Gyn. Brit. Emp. 62, 390, 1955.

26. J.B. Kirsner, A.L. Sheffner
u. W.L. Palmer: Studies on amino acid excretion in man.
III. Amino acid levels in plasma and urine
of normal man fed diets of varying protein
content.
J. Clin. Invest. 28, 716, 1949.
27. B.F. Steele, S. Reynolds
u. C.A. Baumann: Amino acids in the blood and urine of
human subjects ingesting different amounts
of the same proteins.
Nutrition 40, 145, 1950.
28. E.G. Schmidt: The amino acid content of the blood in
health and disease.
Arch. Int. Med. 44, 351, 1959.
29. G.E. Brewer, W.S. Brown,
C.C. Harvey u. M.K. Horwitz: Variations in the individual blood plasma
amino acid level.
J. biol. Chem. 168, 405, 1947.
30. F. Friedberg u.
D. Greenberg: Endocrine regulation of amino acid levels
in blood and tissue.
J. biol. Chem. 168, 405, 1947.
31. E. Kofrányi: Über quantitative Papierchromatographie von
Aminosäuren in Proteinhydrolysaten.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299,
129, 1955.
32. D.D. van Slyke, D.A. Mac Fayden
u. P. Hamilton: Determination of free amino acids by titra-
tion of the carbon dioxide formed in the
reaction with ninhydrine.
J. biol. Chem. 141, 671, 1941.

33. Hijmans van den Bergh: Abbau des Hämoglobins.
Wien. Med. Wschr. 81, 1359, 1931.
34. S. Mancke u.
J. Sommer: Die abgestufte Takata-Reaktion im Serum
zur Diagnose von Leberkrankheiten.
Münch. Med. Wschr. 83, 1707, 1936.
35. N.F. Mac Lagan: Thymol turbidity test: A new indicator
of liver dysfunction.
36. O. Weltmann: Über die Spiegelung exsudativ-entzündlicher
und fibröser Vorgänge im Blutserum.
Med. Klin. 26, 240, 1930.
37. W. Frankl, H.E. Martin
u. M.S. Dunn: Apparent concentration of free tryptophane,
histidine and cystine in pathological urine
measured microbiologically.
Arch. Biochem. 13, 103, 1947.
38. J.E. Wheeler u.
P. György: Studies of urinary excretion of methionine
by normals and by patients having liver
disease.
Am. J. Med. Sci. 215, 267, 1948.
39. M.S. Dunn, S. Akawaie,
H.L. Yeh u. H. Martin: Urinary excretion of amino acids in liver
disease.
J. Clin. Invest. 29, 302, 1950.
40. G.J. Gabuzda jr.,
R.D. Eckhardt u.
C.S. Davidson: Urinary excretion of amino acids in patients
with cirrhosis of the liver and in normal
adults.
J. Clin. Invest. 31, 1015, 1952.

41. F.C. Mann: The effects of complete and of partial removal of the liver.
Medicine 6, 419, 1927.
42. H.G.Knauff, H. Selmair
u. A. Reitlinger: Untersuchungen über die freien Aminosäuren
in Harn und Blutplasmen von Gesunden und
von Leberkranken.
Klin.Wschr. 38, 16, 812, 1960.
43. E. Kirk: Amino-acid and ammonia metabolism in
liver diseases.
Acta Med. Scand. Suppl. 77, 89, 1936.
44. L.J. Witts: Observations on the metabolism of amino-
acids in health and disease.
Quart. J. Med. 22, 477, 1929.
45. B. Weicker: Über den Nachweis gestörter Teilfunktionen
als Grundlage funktioneller Leberdiagnostik.
Z. ges. exp. Med. 81, 441, 1948.
46. P. Braun, S. Kisfaludy
u. M. Dubsky: Quantitative analysis of free amino acids
in normal and pathological human serum
and urine.
Acta Med. Acad. Sc. Hung. 7, 147, 1955.
47. L. Uzman u.D.Denny-Brown: Amino aciduria in hepatolenticular
degeneration (Wilson's disease).
Am. J. Med. Sci. 215, 599, 1948.
48. J. u. R. Steger: Die Störungen des Kupfer- und Aminosäure-
haushaltes bei der hepato-cerebralen Degene-
ration und deren Behandlung mit BAL.
Zschr. f. Nervenheilk. 172, 321, 1954.

49. W.H. Stein, A.G. Bearn
u. S. Moore: The amino acid content of the blood and
urine in Wilson's disease.
J. Clin. Invest. 33, 10, 1954.
50. C.E. Dent u.
J.M. Walshe: Amino-acid metabolism.
Brit. Med. Bull. 10, 247, 1954.
51. M.S. Dunn, E.A. Murphy
u. P.E. Salisbury: Free and apparent amino acids in depro-
teinised plasma of normal and uremic
(nephrectomized) dogs.
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 92, 682,
1956.

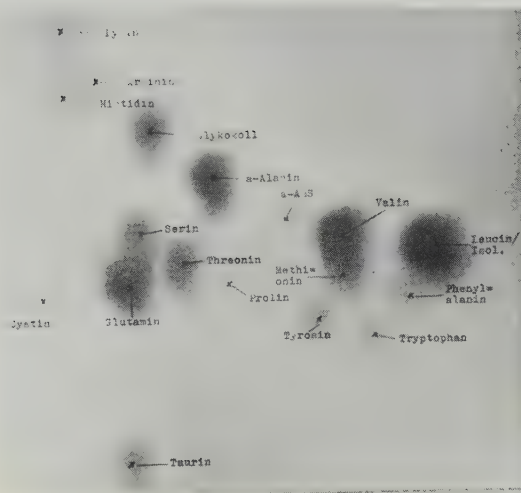


Abb. 1: Kombiniertes 2-dimensionales Elektropherogramm, das die Auftrennung der Plasmaamino-säuren eines Normalfalles zeigt.

Hochspannungselektrophorese bei pH 1,9 mit 70 V/cm. Laufzeit 90 Min. Anschließend aufsteigende Papierchromatographie senkrecht zur elektrophoretischen Laufrichtung in Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 5). Laufzeit 20 Std. Färbung mit Ninhydrin nach Levy u. Chung und Besprühung mit Kupfersulfat. Auftragsstelle am linken unteren Eck.

Abb. 2 - 4: Eiweißbelastung einer gesunden Versuchsperson von 70 kg Körpergewicht mit 220 g Quark (entspricht etwa 35 g Eiweiß = 0,5 g Eiweiß/kg Körpergewicht).

Auftragsmenge jeweils 0,02 ml = 0,5 ml Originalplasma.

Sonst Technik wie bei Abb. 1.



Abb. 2: Nüchternwert



Abb. 3: 1/2 Stunde nach dem Quarkfrühstück

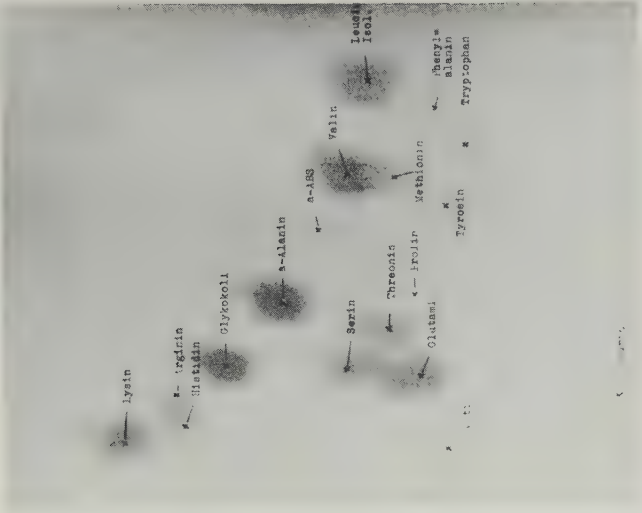


Abb. 4: 1 Stunde nach dem Quarkfrühstück

Abb. 5 u. 6: Hochspannungselektrophoresen bei p_H 3,6 zur Darstellung von Glutaminsäure und Asparaginsäure.

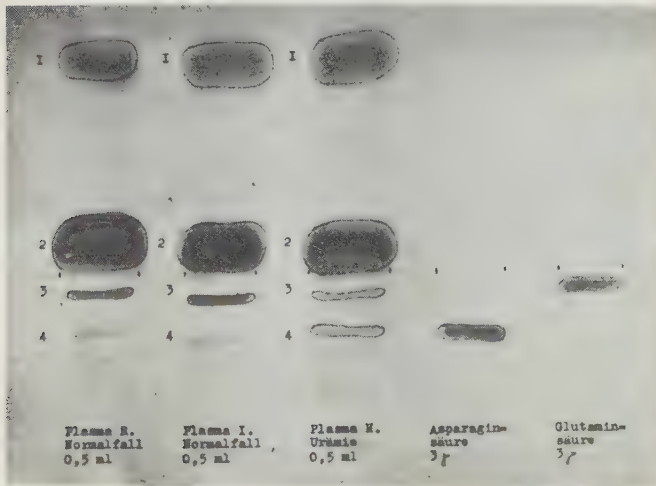
Elektrolyt: Pyridin, Eisessig, Wasser (1 : 10 : 90)

Laufzeit: 60 Minuten

Spannung: 70 V/cm

Färbung: Ninhydrin nach Levy u. Chung (20).

Abb. 5: Gegenüberstellung von jeweils 0,02 ml Plasma ($\approx$ 0,5 ml uneingeengtes Plasma) von Pat. H.F. (chron. Glomerulonephritis) und 2 Normalfällen. Als Testsubstanzen je 3 μ Glutaminsäure und Asparaginsäure.



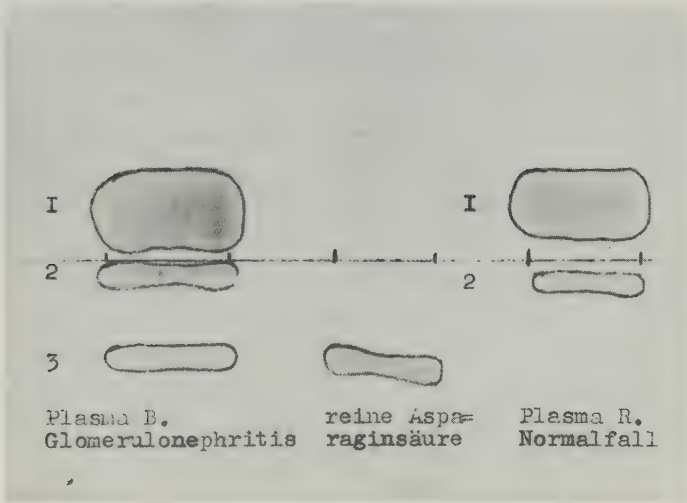


Abb. 6: Gegenüberstellung von jeweils 0,005 ml Plasma (entspricht 0,125 ml Originalplasma) von Pat. B.C. (Glomerulonephritis) und einem Normalfall. Reine Asparaginsäure als Testsubstanz.

NACHWORT

Zum Abschluß der vorliegenden Arbeit möchte ich dem wissenschaftlichen Oberassistenten der II. Medizinischen Klinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. Hermann Zickgraf herzlichst danken für die Überlassung des Themas.

Dem wissenschaftlichen Assistenten der II. Med. Klinik, Herrn Dr. med. Hans-Georg Knauff bin ich zu großem Dank verpflichtet für die mir in Rat und Tat stets erwiesene Hilfsbereitschaft bei Vorbereitung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Auch Herrn Prof. Dr. Otto Wieland darf ich an dieser Stelle verbindlichen Dank sagen für die Großzügigkeit, mit der er jederzeit eine Mitbenützung seiner Laboreinrichtungen gestattete.

Dem Direktor der II. Medizinischen Klinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. Dr. Gustav Bodechtel danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Ministerialdirigenten Alfred Reitlinger und seiner Frau Centa, geb. Kugler, wurde ich am 13. 11. 1934 in München geboren.

Nach Besuch der Volksschule von 1941 bis 1944 trat ich im Jahre 1946 in das Theresiengymnasium in München ein, wo ich im Jahre 1953 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich mein Hochschulstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität München, im Wintersemester 1956/57 studierte ich ein Halbjahr an der Universität Wien und legte dann mein medizinisches Staatsexamen wieder an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München im Juli 1959 ab.

Seit Ende des vergangenen Jahres bin ich als Medizinalassistent im Krankenhaus des III. Ordens, München beschäftigt.

